

## 論文の内容の要旨

氏名：石 島 学

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Applications of ultraviolet photofunctionalized titanium to bone regenerative medicine.

（紫外線光機能化チタンの骨再生医療への応用）

先天性の骨欠損、外傷や腫瘍の切除などによって生じる骨欠損を対象とした骨再生医療が盛んに研究されている。しかし、一度生じた骨欠損を再生することは難しく、より確実に骨を再生する手法の開発が待たれている。一方で、チタンの骨芽細胞に対する親和性を向上される表面処理として、紫外線を用いた光機能化が注目されている。光機能化は、特定の波長と強度を有する紫外線をチタン表面に照射する表面処理方法で、すでに歯科用インプラントで臨床応用されている。多くの基礎的、臨床的研究から、光機能化されたチタンの周囲では、良好な骨形成が起こることが確認されている。しかし、チタンは骨再生医療分野でも用いられているにも関わらず、骨再生医療に光機能化は利用されていない。そこで本研究は、光機能化の骨再生医療への応用について検討した。

第一章では、組織の再生に必要な細胞と細胞外マトリックスを効率よく移植できる手法として注目されている細胞シートを、チタンメッシュで補強した「チタンメッシュ強化型細胞シート」の作製を試行した。この細胞シートは、強度と賦形性を有するチタンメッシュを用いて、細胞シートの弱点である構造的脆弱さを補強することを目的としており、実験では光機能化を含む、作製上の技術的要件の検討を行った。ラット頭蓋骨骨膜から採取した細胞を骨芽細胞分化誘導培地で骨芽細胞に分化させ、この細胞を温度応答性培養皿上で培養し、細胞シートを製作した。構造的安定性に着目した実験として、一枚の細胞シートをチタンメッシュの片面に接着させる手法と、二枚の細胞シートをチタンメッシュの両面に接着させる手法を比較した。その結果、一枚の細胞シートをチタンメッシュの片面に接着させる手法では形態の維持が困難であることが確認され、二枚の細胞シートでチタンメッシュを挟むように両面に接着させる手法が有効であることが確認された。さらに、細胞シートのチタンメッシュへの接着をより強固にするための手法として、チタンメッシュに対する光機能化を検討したところ、光機能化による構造的安定性の向上が認められた。これらの結果から、構造的に安定したチタンメッシュ強化型細胞シートを作製するためには、光機能化されたチタンを挟むように二枚の細胞シートをチタンメッシュの両面に接着する手法が最適であることが示唆された。また、光機能化されたチタンを挟むように二枚の細胞シートをチタンメッシュの両面に接着させて作製したシートを継続して培養したところ、骨芽細胞のマーカーであるアルカリホスファターゼの活性を示し、カルシウムの沈着物を形成したことから、骨芽細胞としての機能を維持していることが確認された。光機能化されたチタン上で細胞シートが維持された結果を受けて、その機構を解明するため、細胞の接着に先立つチタン表面へのタンパクの吸着と接着タンパクであるビンキュリンの発現強度の観察を行った。その結果、光機能化によるチタン表面へのタンパク質吸着量の増加とビンキュリンの発現増加が確認された。これらの結果から、チタンメッシュ強化型細胞シートの作製を行う際に、チタンメッシュを光機能化することで構造的な安定性の向上が得られることが *in vitro* の実験系で示された。

第二章では、骨欠損に対する骨再生誘導療法に用いられるチタンスキャフォールドに対しての光機能化の応用を検討した。光機能化前後の物理化学的特性の評価と、培養骨芽細胞への効果を検討した。未処理をコントロール群とし、光機能化を行った光機能化群との比較検討を行った。チタンスキャフォールドの表面に付着していた炭素量は光機能化により有意に減少し、チタンスキャフォールドは疎水性から親水性に変化した。さらに光機能化されたチタンスキャフォールドに対する骨芽細胞の反応をみるため、ラット骨髄から得られた細胞を骨芽細胞分化誘導培地で培養して骨芽細胞を獲得した。その骨芽細胞をチタンスキャフォールドに播種し、接着細胞数の計測と骨芽細胞としての表現型の観察を行った。その結果、光機能化群でより多くの接着細胞が観察され、骨芽細胞の表現型であるアルカリホスファターゼの活性、カルシウムの沈着物の形成に関しても、それぞれ有意に高いことが確認された。SEM (Scanning Electron

Microscope) と EDS (Energy Dispersive x-ray Spectroscopy) を用いた観察では、光機能化群でより多くの骨の構成元素である P と Ca を含む構造物が観察された。これらの結果から、光機能化はチタンスキャフォールドの骨芽細胞に対する親和性を向上させ、より多くのリン酸化合物の形成が可能になることが示された。

第一章では、チタンメッシュ強化型細胞シートの作製において、光機能化の応用が細胞シートをチタンメッシュ上に維持させるために有効であることが示された。また、第二章では、骨再生誘導療法に用いられるチタンスキャフォールド上への骨芽細胞の接着を光機能化が向上させ、リン酸化合物の形成を促進させることが示された。これらの結果は、光機能化の骨再生医療への応用の可能性と有用性を示唆している。